Aus der Kinderklinik der Staatlichen Akademie für praktische Medizin, Danzig. — (Direktor: Professor Dr. A. Adam).

Vitamin B_1-Ausscheidung und chemischer Nachweis im Harn

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 23. Januar 1939 von

GEORG BECKER

aus Aachen.

1939

DISSERTATIONS-VERLAG G. H. NOLTE DÜSSELDORF

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Bonn.

Referent: Prof. Dr. K n a u e r
Korreferent: Prof. Dr. T i e m a n n

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

MEINEN LIEBEN ELTERN.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546406_0161

INHALTS-VERZEICHNIS

I. Allgemeiner Teil.

II. Versuchs-Teil.

1. Chemischer Nachweis des Vitamin B_1.
2. Biologischer Nachweis im Säuglingsharn mittels des kurativen Taubentests.

I. ALLGEMEINER TEIL.

Die wissenschaftliche Anwendung der Ergebnisse der Vitaminforschung auf die Klinik wird wesentlich gefördert durch Erkennungsmöglichkeiten des „Vitaminstandes" des zu untersuchenden und zu behandelnden Menschen. Einen wichtigen, aber nicht genügenden Hinweis hierauf gibt uns die Ernährungsvorgeschichte. Bei den klassischen Avitaminosen Keratomalacie, Beri-beri und Skorbut verrät das klinische Bild den vorliegenden schweren Mangelzustand, während Hypovitaminosen, die, weil häufiger, das größere praktische Interesse bieten, klinisch wenig charakterisiert sind. Man verfügt heute jedoch über Bestimmungsmethoden, die den Vitaminstand des Menschen zahlenmäßig ermitteln lassen; solange diese aber mit dem Test am Tier arbeiten, sind sie klinisch nur in sehr beschränktem Umfang anwendbar, da die dazu notwendigen Voraussetzungen in der Klinik schwer zu erfüllen sind. Ein Fortschritt wurde erst dann erzielt, als die quantitative chemische Bestimmung der einzelnen Vitamine in der Klinik durchführbar wurde. Man kann heute im Blut Vitamin A colorimetrisch, Vitamin C titrimetrisch und den Vitamin C-Stand des Menschen mit Belastungsprüfungen zahlenmäßig chemisch bestimmen. Dadurch wurden große Fortschritte in der Ernährungslehre, Physiologie und Klinik gewonnen. Für eine einwandfreie wissenschaftliche Aufklärung der Wirkung dieser Vitamine in der Therapie sind Bestimmungen des Vitaminstandes unbedingt erforderlich (Widenbauer, des. und Kühner), und bei ihrer allgemeineren Ausübung hätten manche Irrwege vermieden und noch weitere Kenntnisse gewonnen werden können (Wolff).

Während heute der Vitaminbestand des Menschen an den Vitaminen A und C leicht bestimmt werden kann, ist dies bezüglich der Vitamine der B-Reihe, die ebenfalls eine große Rolle spielen, nicht der Fall. Hier stehen wir erst am Anfang der Erkenntnisse. Die wenigen Untersuchungen, die bis jetzt darüber vorhanden sind, stammen aus den angelsächsischen Ländern und beziehen sich auf die Bestimmung von Vitamin B_1 und Flavin im Harn des Menschen durch Tierversuche. Nachdem von Muckenfuß, Gaglio und van der Walle 1918—1922 die Anwesenheit von Vitamin B_1 im menschlichen Harn festgestellt worden war, unternahmen Helmer, Roscoe und Knott in Amerika quantitative Bestimmungen der Vitamin B_1 Ausscheidung im Urin des

Menschen mittels des Rattenwachstumstestes, Harris und Leong in Cambridge mittels der Bradykardie-Methode an Ratten. Letztere Autoren fanden die Ausscheidung in Abhängigkeit von der Kost, normalerweise bei Erwachsenen und Jugendlichen (17—35 Jahre) in Höhe von durchschnittlich 20 I. Einheiten*) täglich. Sie haben auch ein verhältnismäßig einfaches Verfahren angegeben, das in der Klinik dort anwendbar ist, wo der Ratten-Bradykardie-Test**) durchgeführt werden kann.

Damit sind dem Verfahren zugleich seine Grenzen gezogen. Erst eine chemische Bestimmungsmöglichkeit des B_1 Vitaminstandes wird den Kreis derartiger Untersuchungen erweitern und sie allgemein anwendbar machen können.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit zwei Aufgaben: 1. der Ausarbeitung einer chemischen Bestimmungsmethode von Vitamin B_1 im Harn und 2. der quantitativen Bestimmung der Vitamin B_1-Ausscheidung im Säuglingsharn mittels des kurativen Taubentests.

II. VERSUCHSTEIL.

1. CHEMISCHER NACHWEIS VON VITAMIN B_1 IM HARN.

Jansen und Donath (1926) hatten gefunden, daß ihr aus Reiskeimen gewonnenes kristallinisches Vitamin B_1 mit diazotierter Sulfanilsäure und Kaliumnitrit eine starke Rotfärbung gibt (Reaktion nach Pauly).

Kinnersly und Peters (1927/28) stellten fest, daß diese Reaktion in der Modifikation nach Koessler und Hanke nicht proportional dem Vitamingehalt verlief und außerdem bei den verschiedenen B_1-Präparaten sehr ungleich ausfiel. Es konnte eine starke Abhängigkeit der Reaktion von der Reinheit der betreffenden Präparate nachgewiesen werden. Bei weniger konzentrierten Lösungen nahm die Gelbfärbung, die schon bei den reinsten Vitaminextrakten schwach auftrat, derart zu, daß die Rotfärbung fast oder vollkommen überdeckt wurde.

Kinnersly und Peters verbesserten die Reaktion dadurch, daß es ihnen gelang, einerseits durch geeignete Wahl der Alkalität die Pauly-Reaktion zu vergrößern und anderseits durch Anwendung von Formaldehyd die Rotfärbung zu stabilisieren

*) I. E. = Internationale Einheit = 10 mg VB_1 —Standardadsorbat.
**) Ratten-Bradykardie-Test: Durch VB_1 freie Kost hervorgerufene Pulsverlangsamung wird durch Zufuhr einer bestimmten Menge VB_1 in einer konstanten Zeit rückgängig gemacht.

und ein allmähliches Abblassen der durch Unreinigkeiten bewirkten Gelbfärbung herbeizuführen.

Mit der auf diese Weise abgeänderten Reaktion gelingt es mit ziemlicher Gleichmäßigkeit, noch eine einer I. Einheit entsprechenden Menge Vtamin B_1 nachzuweisen.

Für mein Vorgehen waren die Angaben von Harris und Leong leitend, die das im Harn enthaltene Vitamin B_1 an Tonerde adsorbierten. Um zu beweisen, daß es überhaupt möglich ist, an Tonerde adsorbiertes Vitamin nachzuweisen, wurden zuerst Adsorbate aus vitamin B_1haltigem Wasser untersucht. Es wurden also z. B. 100 ccm H_2O mit einem Gehalt von 100 T. E. mit 1 g Tonerde ¼ Stunde bei ph = 5 ausgeschüttelt und der Ton dann abfiltriert. Das Einhalten eines konstanten ph-Wertes von 5, der mit Salzsäure gegen Bromkresolgrün eingestellt wurde, ist von Wichtigkeit.

Zur Herstellung von Vergleichsreaktionen mit Lösungen von bekanntem Vitamingehalt sowie zu allen Versuchen verwandte ich ausschließlich reines, kristallisiertes Vitamin B_1 (Betaxin).

Der betaxinhaltige Ton wurde zur Extraktion des Vitamins mit wechselnden Mengen Barytwasser ausgewaschen ,das Filtrat in entsprechenden Mengen Schwefelsäure aufgefangen. Der dabei auftretende Niederschlag wurde abfiltriert. Reaktionen wurden angestellt mit dem eingedampften Filtrat, dem Niederschlag und dem Filterrückstand.

Die Erfolge waren durchweg negativ, es trat überall eine mehr oder weniger intensive Gelbfärbung auf. Beim Filtrat, das Vitamin B_1 aufweisen mußte, zeigte sich bereits beim Einengen auf dem Wasserbad eine geringe Gelbfärbung, die ihrerseits schon fähig gewesen wäre, eine positive Reaktion zu verdecken. Auch geht die Zerstörung geringer B_1-Mengen in alkalischer Lösung sehr rasch vonstatten.

Aus diesen Gründen verließ ich dieses Verfahren und versuchte die Reaktion unmittelbar mit der Tonerde anzustellen. Es gelang mit einem Bruchteil der Tonerde eine mehr oder weniger deutliche Rotfärbung zu bekommen; auch der Ton selbst war dabei leicht rosa gefärbt. Es mußte allerdings im Verhältnis zu den im Harn zu erwartenden Mengen ungleich mehr Betaxin verwendet werden, um eine positive Reaktion zu erhalten. Von einer quantitativen Ausbeute konnte also keine Rede sein. Doch waren auch damit die Ergebnisse unregelmäßig, da mit den gleichen Mengen unter möglichst gleichen Bedingungen wiederholte Versuche statt der erwarteten leichten Rotfärbung eine gelbe Reaktion gaben. Es zeigte sich, daß zur Reaktion der Gebrauch von nur ganz frischen Reagentien gefordert werden muß.

Gleichartige Versuche mit Adsorbaten aus Urin zeigten stets eine ausgesprochene gelb-braune Färbung, wie sie der Harn selbst schon mit diazotierter Sulfanilsäure und dem Reagenz gab.

Versuche, die braune Verfärbung auszuschalten, erstreckten sich auf eine Vorbehandlung des Harns und auf eine Reinigung des Tonerdeadsorbats.

Ich versuchte, durch leichtes Aufkochen des Harns unter Zusatz verschiedener Mengen an H_2O_2 und HCl diese störenden Substanzen auszuschalten. Der Harn wurde durch diese Behandlung zwar weitgehend entfärbt, doch wurde das Auftreten der gelbbraunen Verfärbung des Tonerdeadsorbats nicht verhindert. Reinigung des Harns durch Fällung mit Bleiazetat bei alkalischer oder saurer Reaktion brachte ebensowenig Erfolg.

Ich versuchte dann durch eine Behandlung des Tones weiter zu kommen. Die Filterrückstände wurden mehrfach ausgewaschen mit aqua dest. von verschiedenem ph, mit Salzsäurealkohol, ammoniakhaltigem Alkohol, Chloroform, Äther, Schwefelsäure usw. Alle diese Methoden gaben nur geringfügige Ergebnisse. Der Ton wurde zum Teil, z. B. mit Salzsäurealkohol wesentlich entfärbt, die gelbbraune Farbe trat aber bei der Reaktion immer noch auf.

Als Ergebnis zahlreicher Versuche läßt sich jedenfalls sagen, daß die Diazo-Reaktion nach Kinnersly und Peters sicher ungeeignet ist zum chemischen Nachweis von Vitamin B_1 im Harn.

Auch Jansen betont die Unbrauchbarkeit dieser Reaktion zur genauen Bestimmung nicht genügend gereinigter B_1-Präparate.

Unempfindlicher gegen Verunreinigung ist die von Jansen zur quantitativen chemischen Bestimmung ausgearbeitete Methode. Diese beruht auf der von Peters (1935) beobachteten blauen Fluoreszenz, die bei der alkalischen Oxydation von Vitamin B_1 auftritt. Kuhn und andere konnten diese fluoreszierende Substanz, die sie Thiochrom nannten, aus Getreide isolieren. Barger gelang es durch Oxydation mit Ferricyankali Vitamin B_1 in Thiochrom umzuwandeln, desgleichen Vetter und Kuhn mit Porphyrexid.

Jansen stellte fest, daß für die quantivative Umwandlung von Vitamin B_1 in Thiochrom die Menge an oxydierender Substanz ausschlaggebend ist, da durch einen Überschuß an Ferrizyankali das Vitamin wieder zerstört wird. Bei geeigneter Wahl des ph und richtig dosierter Menge Reagenz gelingt es, Vitamin B_1 nahezu quantitativ in Thiochrom überzuführen. Bei Versuchen mit dem Internationalen Standard-Adsorbat gelang ihm die Thiochrombildung am besten unmittelbar mit der Tonerde selbst, in stark alkalischer Lösung. Extraktion mit Essigsäure oder Pyridin brachten weit geringere Erfolge.

Die auftretende Fluoreszenz maß Jansen in dem von Cohen angegebenen Fluorometer.

Im weiteren Verfolg meiner Arbeiten verwandte ich nur mehr die von Jansen angegebene Methode. Wie sich weiter zeigte, brachte der Gebrauch eines Fluorometers, das mir in liebenswürdiger Weise Herr Dr. Voges im Physikalischen Institut der Technischen Hochschule Danzig zur Verfügung gestellt hatte, für meine Vorversuche keine Vorteile. Es wurde bei diesen Vorversuchen nur Wert darauf gelegt, eine eben für das Auge noch sichtbare Fluoreszenz zu erhalten. Die Methode von Jansen änderte ich in der Weise ab, daß ich die fluoreszierende Substanz statt mit 13 ccm Isobutylalkohol nur mit 1,25 ccm auszog, davon 1 ccm mit der Pipette abzog und der besseren Sichtbarkeit wegen in einem Reagenzglas mit 1 cm H_2O unterschichtete. Größere Mengen an Isobutylalkohol bewirken nämlich eine derartige Verdünnung, daß eine sonst für das Auge noch gut erkennbare Reaktion nicht mehr einwandfrei festgestellt werden kann.

Wesentlich erleichtert wird die Feststellung der Fluoreszenz, wie auch sonst bei Fluoreszenzprüfungen üblich, durch Beobachtung in einer Art camera obscura. Benutzt wurde ein mit schwarzem Papier ausgekleideter Kasten, bei dem nur durch einen seitlichen Schlitz Licht einfallen konnte. Möglichst in dessen Nähe befindet sich eine Öffnung zum Einstecken eines Reagenzglases. Beobachtet wird durch zwei gegen Lichteinfall abgeschirmte Gucklöcher.

Einen großen Fortschritt stellte ferner die Betrachtung beim Licht einer Quecksilberdampflampe dar. Noch deutlicher wurde dabei die Fluoreszenz durch Vorschalten eines U.V.Filters. Auf diese Weise gelang es, noch einwandfrei ⅓ T.Einheit*) und etwas weniger zu erkennen.

Ist diese Bestimmungsmethode nach Jansen auch empfindlicher und durch andere Begleitstoffe weniger störbar, so doch nicht in allen Fällen.

Es gelang anfänglich nicht, selbst größere dem Harn zugefügte Mengen in der Tonerde nachzuweisen. Dabei wurden die zur Reaktion angewandten Mengen Tonerde und Ferrizyankali weitgehend variiert, auch die Zeit des Ausschüttelns mit dem Reagenz sowie das Ausziehen mit Isobutylalkohol in ziemlich weiten Grenzen abgeändert; ein einigermaßen befriedigender Erfolg wurde zunächst aber nicht erzielt.

Eine Umgehung der Ausschüttlung mit Tonerde durch Eindampfen des Harns im Vakuum und Reaktion mit dem Harnkon-

*) T. E. = Taubeneinheit = 2—3 Internationale Einheiten.

zentrat selbst führte ebenfalls nicht zum Ziel. Es müssen also im Harn auch diese Reaktion irgendwie störende Substanzen vorhanden sein.

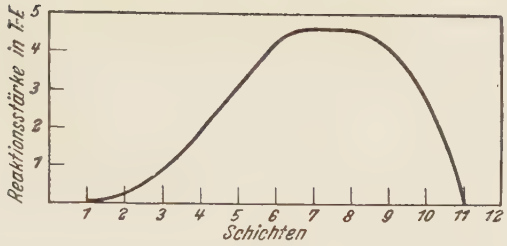
Das konnte auch tatsächlich nachgewiesen werden. Ich prüfte verschiedene Harnfraktionen auf ihre eine nachweislich positive Reaktion hemmende Wirkung hin. Zuerst wurde der Harn mit Ammonsulfat gesättigt und der sich dabei bildende Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag und das Adsorbat aus dem erhaltenen Filtrat gab keine positive Reaktion, doch konnten beide bei Zusatz zu reinen Vitamin B_1-Lösungen positive Reaktionen gänzlich unmöglich machen. Es galt also diese reaktionsverhindernden Stoffe zu entfernen.

Welcher Art sind nun diese hemmenden Stoffe? Jansen nimmt an, daß es reduzierende Stoffe seien, welche die Reaktion mit Getreideadsorbaten verhindern. Bei Harnadsorbaten könnten dies die reduzierenden Harnstoffe sein (Nothhaas und Widenbauer), die leicht an Tonerde gehen und auch in alkalischem Medium reduzierend wirken. Tatsächlich konnten auch ein mir von Herrn Dr, Widenbauer überlassenes Harnfarbstoffkonzentrat und die durch Fällung des Urins mit Ammonsulfat gewonnene Urochrom-B-fraktion (Heilmeyer) die Thiochrom-Reaktion verhindern. Die Urochrom-B-Fraktion kann jedoch nicht der alleinig hemmende Stoff sein, da Auswaschen des Urochrom-B-Niederschlags mit heißem 96% Alkohol die hemmende Wirkung dieser Fraktion etwas zu verringern vermochte. Urochrom B ist nämlich in 96%igem Alkohol fast unlöslich.

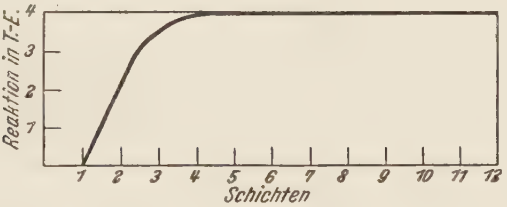
Aus solchen Erwägungen heraus versuchte ich weiterhin Tonerdeadsorbate mittels der chromatographischen Adsorptionsanalyse zu gewinnen, ein Weg der sich als gangbar erwies.

Es wurde Harn mit Betaxinzusatz unter den dabei gebräuchlichen Bedingungen durch Tonkerzen von verschiedener Höhe filtriert. Vor dem Durchlaufen des Harns und nachher wurde die Tonsäule mit aqua dest. von ph = 5 durchgewaschen. Die Kerze wurde dann in Segmente von 5 mm oder auch weniger, je nach deren Höhe, aufgeteilt und getrocknet. Alsdann wurden Reaktionen mit einem abgewogenen Bruchteil der verschiedenen Schichten angesetzt. Bei den ersten, stark gefärbten Schichten fiel die Reaktion durchweg negativ aus; in den darauf folgenden weniger gefärbten Lagern ergab die Reaktion eine bis zu einer gewissen Höhe ansteigende Fluoreszenz, die dann in den tieferen Schichten wieder etwas schwächer und schließlich negativ war.

Nun versuchte ich nachzuweisen, in wieweit die einzelnen Schichten fähig wären, eine Reaktion von 4 T.Einheiten zu stören.



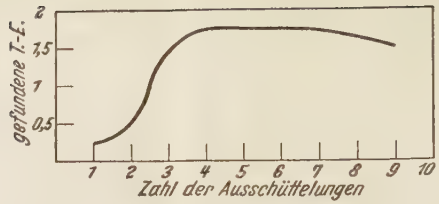
50 mg der obersten Schicht verhinderten die Reaktion vollkommen, die zweite schwächte noch etwas ab, während die folgenden dies nicht konnten.



Die Tatsache, daß die obersten Schichten zugleich auch am stärksten gefärbt waren, während der Harn schließlich fast farblos durchlief, läßt die Vermutung weiter erhärten, daß die Harnfarbstoffe (Urochrom) reaktionshemmend wirken.

Durch Kochen der obersten Schicht mit geeigneten Mengen H_2O_2 und HCl, wodurch die Harnfarbstoffe zerstört werden (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Widenbauer), gelang es, die reaktionshemmende Wirkung, allerdings auch die Thiochrom-Reaktion vollkommen aufzuheben.

Die mit der Tonkerze erzielten Ergebnisse brachten mich dazu, die schon früher versuchte, damals ergebnislose, fraktionierte Ausschüttelung weiter zu verfolgen. Wenn ich früher mit jeweils geringen Mengen Ton hintereinander ausschüttelte, dann die einzelnen Portionen insgesamt abfiltrierte und mit einem Teil des Gemisches Reaktionen versuchte, zentrifugierte ich diesmals die zum Ausschütteln benutzten 200 mg jeweils ab und stellte damit gesondert Reaktionen an. Die einzelnen Tonerdefraktionen waren verschieden gefärbt. Während die erste fast ziegelrot war — je nach der Eigenfarbe des angewandten Harns — nahm die Färbung bei den späteren Ausschüttelungen ab. Die Reaktionen ergaben folgendes Bild, das mit den Ergebnissen der Tonkerze übereinstimmt.



Überdies zeigte sich dabei der maßgebliche Einfluß der verwandten Tonart. In einem Parallelversuch mit dem gleichen Urin und gleichem Betaxinzusatz, jedoch anderem, gröberem Ton, konnten keine einwandfrei positiven Reaktionen erzielt werden. Deshalb wurde von nun an nur mehr mit Tonerde „Merck" gearbeitet.

Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurden immerhin noch im Verhältnis zu den im Urin tatsächlich zu vermutenden Mengen Vitamin B_1 — nach Harris und Leong scheidet der gesunde Erwachsene durchschnittlich 20—30 I.Einheiten im 24-Stundenharn aus — große Vitamindosen verarbeitet, z. B. 50 T.Einheiten in 50 ccm Harn.

Wollte man die beschriebenen Methoden zum quantitativen Nachweis des im Tagesharn ausgeschiedenen Vitamin B_1 anwenden, dann mußte es gelingen, immerhin noch erheblich geringere Mengen Vitamin auch in größeren Mengen Harn möglichst vollkommen festzustellen.

Eine Möglichkeit dazu gab der Zusatz von Methylalkohol bei der Reaktion. Jansen hat, wie bereits erwähnt, die starke Abhängigkeit des Reaktionsausfalls von der benutzten Menge Ferrizyankali gefunden. Setzte er nun zu reinen B_1-Lösungen vor Zugabe von NaOH Methylalkohol zu, dann minderte selbst ein 20facher Überschuß an Ferrizyankali die Reaktion nicht mehr. Dasselbe trifft auch bei Adsorbaten zu.

Für den Nachweis von Vitamin B_1 im Harn ist diese Tatsache von besonderer Bedeutung, da ein Schwanken des Vitamingehaltes in weiten Grenzen möglich ist und man daher nie weiß, welche Menge an oxydierender Substanz die richtige ist und ein wie großer Überschuß notwendig ist, um die vielleicht noch vorhandenen reduzierenden Bestandteile zu paralysieren. Außerdem ist bei geringen Mengen Vitamin selbst ein kleiner Überschuß natürlich weit gefährlicher als bei großem Vitamingehalt. Die Anwendung von Methylalkohol verbesserte meine Ergebnisse z. T. um ein Vielfaches. Wo ich bisher nur Reaktionen erhielt, die etwa ¼ T.Einheit entsprechen mochten — bei derart geringen Mengen ist ein genauer Vergleich mit dem Auge nicht mehr möglich — war die Fluoreszenz jetzt stärker, etwa gleich einer Einheit.

Mit der letztgenannten Methode und der fraktionierten Ausschüttelung konnte ich schließlich noch 10 T.E. in 50 ccm Harn nahezu quantitativ nachweisen. Dieselbe Menge aus 100 ccm herauszuholen war jedoch schon nicht mehr möglich.

Eine Einengung des Harns schien also angebracht. Die Ergebnisse wurden dabei ungünstiger, was dadurch zu erklären ist, daß die in 100 ccm enthaltenen reaktionshemmenden Stoffe sich nun auf die gleiche Menge Tonerde verteilen. Es genügt also die erste Ausschüttelung nicht, um den Hauptteil dieser Stoffe aufzunehmen, vielmehr werden auch noch die folgenden Tonerden dazu herangezogen.

Günstiger waren hierbei die Versuche mit der Tonkerze. Es gelingt nämlich den molekular wohl gröberen, störenden Begleitstoffen selbst in dieser Konzentration nicht, die obersten Schichten zu passieren. Sie werden zum weitaus größten Teil bereits dort abgelagert, während Vitamin B_1 ohne Schwierigkeiten erst in tieferen Schichten adsorbiert wird.

Es war tatsächlich möglich, auf diese Art 20 T.E. in 100 ccm Harn auf 50 ccm eingeengt fast quantitativ herauszuholen und zur Reaktion zu bringen. Bei der Filterkerze empfiehlt es sich, den Harn einzuengen, da sonst die Durchlaufzeiten zu groß werden und dabei eine Zersetzung des Harns und damit auch des Vitamins befürchtet werden muß.

Eine nochmalige Anwendung der Reaktion nach Kinnersly und Peters mit diesen gereinigten Tonkerzen oder fraktionierten Adsorbaten war wieder ohne Erfolg.

Eine Schwierigkeit für die quantitative B_1-Bestimmung besteht noch darin, daß die Zunahme der Fluoreszenz für das freie Auge bei Anwendung von mehr als 5 T.E. nicht mehr dem Beer'schen Gesetz folgt. Es müssen daher Verdünnungen vorgenommen werden. Bei Benutzung des Fluorometers dürften diese Schwierigkeiten behoben werden können.

Die Durchführung einer B_1-Bestimmung im Harn gestaltete sich zuletzt folgendermaßen:

100 ccm Harn + 20 T.E. werden eingestellt auf ph = 5, dann in 2 Portionen zu je 50 ccm geteilt und 5 bis 10 mal mit je 200 mg Tonerde je 5 Minuten lang ausgeschüttelt. Die einzelnen Tonerdefraktionen werden jeweils abzentrifugiert. Reaktionen wurden angestellt mit dem getrockneten Ton unter Zugabe von einem Gemisch aus 0,5 ccm 1% Ferrizyankalilösung

+ 1 ccm Methylalkohol
+ 2 ccm 15% NaOH

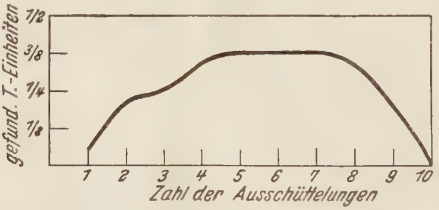
Die Menge Ferrizyankali hängt ab von der zur Reaktion verwand-

ten Menge Tonerde, und zwar für: 50 mg 0,3 ccm 1% Ferrizyankalilösung, für 100 mg bis 200 mg 0,5 bis 1 ccm.

Geschüttelt wird damit 5 bis 10 Minuten lang; dann wird extrahiert mit 1 ccm Isobutylalkohol, abzentrifugiert und die Isobutylalkoholschicht abpipettiert.

Mit 20 T.E. in 100 ccm Harn wurden dabei folgende Werte erzielt, wenn von den zur Ausschüttelung gebrauchten 200 mg 100 mg zur Reaktion gebracht wurden.

Die Gesamtsumme der in 9 Ausschüttelungen nachgewiesenen Einheiten beträgt 3—4 T.E. Dieser Wert muß verdoppelt werden, da die Reaktion jeweils nur mit der halben Menge Ton angestellt wurde. Von 10 T.E. in 50 ccm wären also 6—8 T.E. nachgewiesen, was für 100 ccm 12—16 T.E. entspricht.



Damit ist erstmalig im Groben ein Weg gezeigt, auf welchem Vitamin B_1 im Harn chemisch quantitativ bestimmt werden kann. Dies ist allerdings für den klinischen Gebrauch noch weiter auszuarbeiten, erscheint mir aber ohne wesentliche Schwierigkeiten möglich. Eine Bestimmung des Vitamin B_1-Standes hätte dann wohl in Verbindung mit einer Vitamin B_1-Belastungsprüfung durch chemische Bestimmung der überschüssigen Vitaminausscheidung im Harn zu erfolgen.

Ich führte dann auch erstmalig derartige Belastungsprüfungen durch, indem ich 3 Säuglingen je 800 T.E. reines Vitamin B_1-Chlorhydrat i. m. injizierte und an den beiden folgenden Tagen die Ausscheidung im Urin untersuchte. Dabei konnten chemisch 15—30 T.E. und bei Kontrolle mit dem kurativen Taubentest 20—34 T.E. nachgewiesen werden.

2. BIOLOGISCHER NACHWEIS VON VITAMIN B_1 IM SÄUGLINGSHARN MITTELS DES KURATIVEN TAUBENTESTES.

Da wiederholt auf die Möglichkeit einer ungenügenden Versorgung des Säuglings mit Vitamin B_1 von verschiedenen Autoren aufmerksam gemacht und Untersuchungen über den Vitamin B_1-

Stand des Säuglings und die Ausscheidung im Urin in Deutschland nicht vorgenommen worden sind, erschien es angezeigt, solche bei Säuglingen unter verschiedenen Ernährungsbedingungen durchzuführen.

Es wurde dazu die biologische Bestimmung im kurativen Taubentest gewählt, da sie einfach und genau auszuführen ist. Zur Verfütterung gelangten Tonerdeadsorbate des Tagesharns, der in geeigneten Auffangvorrichtungen unter Toluol gesammelt wurde. Es wurde nach den Angaben von Harris und Leong verfahren.

Die Prüfung der Wirkamkeit der Adsorbate erfolgte an rein spastisch erkrankten Tauben unter den dabei allgemein vorgeschriebenen Kautelen, insbesondere unter vorherigem Ausschluß einer Heilung durch Wärme oder i. m. Glukoseinjektion. Darnach erhielten die Tauben die Tonerde, die mit Wasser zu einem Brei angerührt worden war, mit der Pipette per os.

Eine Übersicht über die Ergebnisse, die nur orientierenden Wert beanspruchen, bringt nachfolgende Tabelle.

Nr. des Versuchs	Tagesmenge Harn in ccm	Adsorbatgabe in Bruchteilen d. Tagesmenge	Gesundung für Stunden	B_1-Ausscheid. in 24 std. Harn T.E.
1.	60	1/4	34	5,5
2.	320	1/2	40	3,3
3.	215	1/4	141	24
4.	340	1/2	37	3
5.	65	1/1	141	6
6. 1. 2. Tag	160	1/2	156	6,5
7. 3. 4. Tag nach Injektion von 800 T.E. Betaxin	200	1/4	288	24

Anm.:

1. W. Kl., männl., 7 Mon. 5400 g, floride Rachitis, manifeste und latente Tetanie, ac. Ernährungsstörung. 4. Mon. Brust, dann Halbmilch; ab 7. Mon. Brei; jetzt: 600 g Säure-Fettmilch.

2. E. W., männl., 4 Mon. 4300 g, ac. recidiv. Ernährungsstörung; Brust, Halbmilch, dann Halbmilch; jetzt: 800 g Säure-Fettmilch.

3. K. B., männl., 5½ Mon. 6400 g, floride Rachitis, manifeste Tetanie, Bronchitis; 1 Mon. Brust, Flasche: ab 4. Mon. Brei, Obst; jetzt: 800 g Säure-Fettmilch.

4. K. S., männl., 3½ Mon. 4900 g, grippaler Infekt, floride Rachitis, alimentäre Anaemie; 10 Wochen Brust, dann Halbmilch; jetzt: 800 g Säure-Fettmilch.

5. H. G., weibl., 6 Mon. 4400 g, Hydrocephalus, Dystrophie, mittelschwere Rachitis, Bronchitis; 3 Mon. Brust, dann Halbmilch; jetzt: 500 g Diätmilch.

6. 7. H. G., 6½ Mon. 5400 g, schwerer Mehlnährschaden; 3 Mon. Brust, dann Halbmilch, Koch- odre Nährzucker; jetzt: 300 g Diätmilch.

Drei weitere Säuglingsharne, die kein Vitamin B_1 zu enthalten schienen, konnten aus äußeren Gründen nicht weiter geprüft werden.

Aus diesen Befunden sollen weiter keine Schlußfolgerungen gezogen werden; sie geben einen ungefähren Anhalt für den Vitamin B_1-Tagesverbrauch des Säuglings durch Subtraktion von der in der Kost enthaltenen Menge Vitamin B_1. Unter der Annahme, daß Kuhmilch durchschnittlich 20 Rattenwachstums-Einheiten (R.W.E.) in 100 ccm enthält (Neuweiler) und 1 Rattenwachstums-Einheit im Mittel 0,6 Tauben-Einheiten (Kurativer Test) entspricht, errechnen sich folgende Werte:

Nr.	Zufuhr	B_1-Ausscheidung	B_1-Tagesverbr. Taubentagesdosis	pro kg Körpergewicht
1.	600 g $^2/_3$ Milch = 400 g Kuhmilch = 80 R.W.E. = 48 T.E.	5,5	42,5	8
2.	800 g $^2/_3$ Milch = 530 g Kuhmilch = 107 R.W.E. = 64 T.E.	3,3	61	14
3.	800 g $^2/_3$ Milch = 64 T.E.	24	40	6
4.	800 g $^2/_3$ Milch = 64 T.E.	3	61	12
5.	500 g Diätmilch*) = 500 g Kuhmilch = 100 R.W.E. = 60 T.E.	6	54	12
6.	300 g Diätmilch*) = 300 g Kuhmilch = 60 R.W.E. = 36 T.E.	6,5	29,5	6

Zu beachten ist, daß sich diese Werte von 29,5 bis 61 T.E. Vitamin B_1-Tagesverbrauch auf kranke, nicht fiebernde Säuglinge beziehen und auf Ausscheidungsbestimmungen an einem Tage beruhen. Neuweiler gibt den durchschnittlichen Tagesverbrauch des 3 Monate alten Säuglings mit 30—50 R.W.E. (= 18—30 T.E.) an.

*) Diätmilch ist eine natürliche Sauermilch, deren B_1-Gehalt unbekannt ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde versucht, Vitamin B_1 im Harn chemisch nachzuweisen. Es wurde an Tonerde adsorbiert und mit dieser oder ihren Eluaten chemische Reaktionen nach Kinnersly und Peters und nach Jansen angestellt. Erstere Reaktion läßt sich nicht auf Tonerdeadsorbate aus dem Harn anwenden. Auch die Reaktion nach Jansen wird durch Harnbestandteile gestört, besonders durch Harnfarbstoffe (Urochrom). Erst nach Erzielung besonders gereinigter Tonerdeadsorbate durch die chromatographische Adsorptionsanalyse und fraktionierte Ausschüttelung gelang es, Vitamin B_1 in verhältnismäßig geringen Mengen Harn nachzuweisen. Säuglingen injiziertes kristallisiertes Vitamin B_1-Chlorhydrat konnte dann im Harn chemisch nachgewiesen werden. So wurde im Prinzip ein Weg gezeigt, der die Bestimmung des „Vitamin B_1-Standes" beim Menschen auf chemischem Wege unter Anwendung einer Belastungsprüfung ermöglicht.

Ferner wurde bei einigen kranken Säuglingen die Vitamin B_1-Ausscheidung im Harn mittels des kurativen Taubentestes bestimmt. Sie betrug 3—24 T.E. täglich. Die Berechnung des ungefähren Tagesverbrauchs ergab zwischen 29—61 T.E. oder 6—14 T.E./kg Körpergewicht.

Herrn Professor Adam und Herrn Dr. Widenbauer bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die liebenswürdige Untestützung in Rat und Tat zu besonderem Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. Knauer danke ich für die freundliche Übernahme des Referates.

LITERATUR

Gaglio, Policlinico (sez. prat.) **26.** 1381 (1919).
Harris, L. J. und P. Leong, Lancet **1936.** 886
Helmer, O. M., Proc. Soc. Ep. Biol. Med. **33.** 1187 (1935).
Jansen, B. C. P., Rec. Trav. chim. Pays-Bas **55.** 1046 (1936).
Kinnersly, H. W. und R. A. Peters, Bioch. Journ. **28.** 667 (1934).
Knott, E. M., J. Nutrit. **12.** 597 (1936).
Muckenfuss, A. M., Jour. Amer. Chem. Soc. **1918.** 1606
Neuweiler, W., Die Vitamine der Milch S. 122, H. Huber, Bern (1936).
Nothhaas, R. und F. Widenbauer, Z. exp. Med. **93.** 664 (1934).
Pauly, Z. phys. Chem. **1904.** 508.
Peters, R. A., Nature **17.** 135 (1935).
Roscol, Biochem. J. **30.** 1053 (1936).
Walle, N. van der, Biochem. Jour. **16.** 713 (1922).
Widenbauer, F., Die Ernährung, **2.** 60 (1937), ders. und A. Kühner, Z. Vitaminf. **6.** 50 (1937).
Wolff, L. K., Schweiz. med. Wschr. **1936.** 979.

LEBENSLAUF

Am 19. Juli 1912 wurde ich als Sohn des Arztes Leopold Becker und seiner Frau Helene geb. Urban zu Aachen geboren.

Dort besuchte ich die Vorschule des Kaiser-Karls-Gymnasiums und absolvierte dann die neun Stufen des eigentlichen Gymnasiums. Ostern 1932 legte ich daselbst meine Reifeprüfung ab.

Ich studierte an den Universitäten Innsbruck, Bonn, Freiburg, Kiel und an der Staatlichen Akademie für praktische Medizin in Danzig. Nach dem 5. Semester legte ich die ärztliche Vorprüfung in Bonn ab.

Während meines Studiums in Danzig im Sommersemester 1936 und Wintersemester 1936/37 fertigte ich die vorliegende Arbeit an.

Mein medizinisches Staatsexamen bestand ich im Sommersemester 1938 in Bonn.